



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10210993 A**(43) Date of publication of application: **11.08.98**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 31/70
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 45/00
A61K 48/00
A61K 48/00
C07K 14/705
C12N 5/10
C12P 21/02
C12Q 1/02
/(C12P 21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number: **10015539**(22) Date of filing: **28.01.98**(30) Priority: **28.01.97 US 97 789982**(71) Applicant: **SMITHKLINE BEECHAM CORP**(72) Inventor: **SATHE GANESH
BERGSMA DERK**(54) **CDNA CLONE HE8CH90 CODING NEW
7-TRANSMEMBRANE RECEPTOR**

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new base sequence comprising a sequence high in the identity with a base sequence coding a G protein-bound receptor (HE8CH90) containing a specific amino acid sequence, and used for producing a receptor useful for treating syndromes related to the imbalance of the HE8CH90, etc.

SOLUTION: A new isolated polynucleotide contains a nucleotide sequence having the identity by at least 80% over its whole length with a nucleotide sequence coding a polypeptide of the formula, or a nucleotide sequence complementary to the above nucleotide sequence. The new polypeptide codes the G protein-bound receptor (HE8CH90) polypeptide and is useful for producing the HE8CH90 polypeptide used for treating syndromes related to the imbalance of the HE8CH90, etc. The nucleotide is obtained by screening a cDNA library originated from the mRNA of human fetal brain, etc., by an expression sequence tag(EST) analysis method.

```

Met Val Ile Met Gly Gln Cys Tyr Tyr Asn Glu Thr Ile Gly Phe Phe
 1           5           10           15
Tyr Asn Asn Ser Gly Lys Glu Leu Ser Ser His Trp Arg Pro Lys Asp
      20           25           30
Val Val Val Val Ala Leu Gly Leu Thr Val Ser Val Leu Val Leu Leu
    35           40           45
      |
      |
      |
      |
Glu Ser Val His Tyr Thr Ser Ser Ala Gln Gly Gly Ala Ser Thr Arg
    325           330           335
Ile Met Leu Pro Glu Asn Gly His Pro Leu Met Asp Ser Thr Leu
    340           345           350

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-210993

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/70	A D U	A 6 1 K 31/70	A D U
38/00	A B F	45/00	
	A B N	48/00	A A B
	A C V		A D Y
審査請求 未請求 請求項の数28 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平10-15539	(71) 出願人	591002957 スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406- 0939、キング・オブ・ブルシア、スウェー ドランド・ロード709番
(22) 出願日	平成10年(1998) 1月28日	(72) 発明者	ギャネシュ・サザ アメリカ合衆国19406ペンシルベニア州キ ング・オブ・ブルシア、ハンターズ・ラン 107番
(31) 優先権主張番号	0 8 / 7 8 9 9 8 2	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名) 最終頁に続く
(32) 優先日	1997年1月28日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 新規7-トランスメンブラン受容体をコードしているcDNAクローンHE 8 CH90

(57) 【要約】

【課題】 HE 8 CH 9 0 ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびに組み換え法によりかかるポリペプチドを製造する方法、ならびにHE 8 CH 9 0 のバランス不良関連症状の治療プロトコールの設計におけるHE 8 CH 9 0 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用を提供する。

【解決手段】 配列番号：2のポリペプチドまたはその対応フラグメントをコードしているヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；あるいは上記ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対してその全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；あるいは上記ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

【請求項2】 DNAまたはRNAである請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項3】 ヌクレオチド配列が配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するものである請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項4】 ヌクレオチド配列が配列番号：1に含まれるHE8CH90ポリペプチドをコードしている配列を含むものである請求項3のポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3のポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブまたはプライマー。

【請求項7】 発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、配列番号：2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、HE8CH90ポリペプチドを生成する能力のある発現系を含むDNAまたはRNA分子。

【請求項8】 請求項7の発現系を含む宿主細胞。

【請求項9】 HE8CH90ポリペプチドの生成に十分な条件下で請求項8の宿主を培養することを特徴とするHE8CH90ポリペプチドの製造方法。

【請求項10】 該ポリペプチドが該細胞の表面に発現される請求項9の方法。

【請求項11】 さらに培地からポリペプチドを回収することを含む、請求項9の方法。

【請求項12】 請求項7の発現系で宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションして、適当な培養条件下で宿主細胞がHE8CH90ポリペプチドを生成するようにすることを特徴とする、HE8CH90ポリペプチド生成する細胞の製造方法。

【請求項13】 請求項12の方法により製造される細胞。

【請求項14】 配列番号：2に含まれるアミノ酸配列に対してその全長にわたり少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むHE8CH90ポリペプチド。

【請求項15】 配列番号：2のアミノ酸配列を含む請求項14のポリペプチド。

【請求項16】 配列番号：2のポリペプチド。

【請求項17】 請求項11の方法により製造されるHE8CH90ポリペプチド。

【請求項18】 請求項14のHE8CH90ポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項19】 (a) 受容体に対する治療上有効量のアゴニストを対象に投与すること；および／または

(b) 受容体活性をインビボで生じる形態のHE8CH90ポリヌクレオチドを対象に与えることを特徴とする、HE8CH90活性の増強を必要とする対象の治療方法。

【請求項20】 (a) 受容体に対する治療上有効量のアнтаゴニストを対象に投与すること；および／または (b) 受容体をコードしているヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子を対象に投与すること；および／または (c) 受容体リガンドを求めて受容体と競争する治療上有効量のポリペプチドを対象に投与することを特徴とする、HE8CH90活性の阻害を必要とする対象の治療方法。

【請求項21】 (a) 対象のゲノムにおいてHE8CH90をコードしているヌクレオチド配列中の変異の存在または不存在を決定すること；および／または (b) 対象由来の試料中のHE8CH90の存在または発現量を分析することを特徴とする、対象におけるHE8CH90の発現または活性に関連した疾病またはかかる疾病に対する感受性の診断方法。

【請求項22】 (a) 請求項13の細胞を候補化合物と接触させること；(b) 次いで、候補化合物の細胞への結合能を評価することを特徴とする、HE8CH90に結合する化合物の同定方法。

【請求項23】 候補化合物が、細胞表面におけるHE8CH90ポリペプチドの活性化により発生するシグナルを生じさせるかどうかを決定することをさらに含み、該シグナルを発生させる候補化合物がアゴニストであると同定されるものである、請求項22の方法。

【請求項24】 請求項23の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項25】 細胞をHE8CH90ポリペプチドに対する既知アゴニストと接触させること；次いで、該アゴニストにより発生するシグナルが該候補化合物の存在下において減少するかどうかを決定することをさらに含み、該シグナルを減少させる候補化合物が該HE8CH90に対するアンタゴニストであると同定される、請求項22の方法。

【請求項26】 請求項25の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項27】 配列番号：1の配列またはそのフラグメントの配列を有するプローブを用いて厳密なハイブリダイゼーション条件下でHE8CH90遺伝子を含む適当なライブラリーをスクリーニングし、次いで、DNA配列を単離することにより得ることのできるDNA配列を必須として含むポリヌクレオチド。

【請求項28】 配列番号：1のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を発現することにより得ることのできるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、それによりコードされるポリペプチド、ならびにかかるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、ならびにそれらの製造に関する。より詳細には、本発明ポリヌクレオチドおよびポリペプチドはG蛋白結合受容体（以下、HE8CH90という）に関連している。また本発明は、かかるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの阻害または活性化にも関する。

【0002】

【従来の技術】医学的に重要な多くの方法が、G蛋白および／または第2のメッセンジャー（例えば、cAMP）を含むシグナル伝達経路に関与している蛋白により行われているということは、十分にわかっている（Lefkowitz, Nature, 1991, 351, 353-354）。本明細書では、これらの蛋白を、G蛋白またはPPG蛋白に関する経路に関与する蛋白という。これらの蛋白のいくつかの例としては、GPC蛋白（例えば、アドレナリン作用性因子およびドパミン（Kobilka, B. K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B. K. et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J. R., et al., Nature, 1988, 336:783-787））、G蛋白自体、エフェクター蛋白（effector proteins）（例えば、ホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼおよびホスホジエステラーゼ）、ならびにアクチュエーター蛋白（actuator proteins）（例えば、蛋白キナーゼAおよび蛋白キナーゼC）（Simon, M. I., et al., Science, 1991, 252:802-808））が挙げられる。例えば、シグナル伝達の1の形態において、ホルモン結合の効果は細胞内酵素アデニレートシクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化はヌクレオチドGTPの存在による。GTPはホルモン結合にも影響する。G蛋白は、ホルモン受容体により活性化された場合には、GTPを結合GDPに交換することが示された。次いで、GTP担持形態は活性化アデニレートシクラーゼに結合する。G蛋白自体により触媒されるGTPからGDPへの加水分解によりG蛋白はその基底不活性形態に戻る。かくして、G蛋白は2重の役割、すなわち、受容体からエフェクターへのシグナルを遅延させる中間体およびシグナル間隔を制御する時計としての作用を行う。

【0003】G蛋白結合受容体（7TM受容体としても知られる）の膜蛋白遺伝子スーパーファミリーは、7つの推定上のトランスメンブランドメインを有するものと特徴づけられている。ドメインは、細胞外または細胞質ループにより結合されたトランスメンブラン α -ヘリックスを示すと考えられている。G蛋白結合受容体は、広範な生物学的活性受容体を包含し、例えば、ホルモン、ウイルス、成長因子および神経受容体を包含する。G蛋白結合受容体は、少なくとも8個の種々異なる親水性ループに結合した約20ないし30個のアミノ酸からなるこれら7個の保存された疎水的な配列を含むものとして特徴づけられている。結合受容体のG蛋白ファミリーは

ドパミン受容体を包含し、それは精神病および神経学的疾病の治療に使用される神経弛緩薬に結合する。このファミリーのメンバーの他の例は、カルシトニン、アドレナリン作動性物質、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン作動性物質、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、スロンビン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子-1、ロドプシン、オドラント、およびサイトメガロウイルス受容体が挙げられるが、これらに限らない。たいていのG蛋白結合受容体は、最初の2個の細胞外ループ中にそれぞれ1個の保存されたシステイン残基を有し、ジスルフィド結合を形成して機能的蛋白構造を安定化していると考えられている。7個のトランスメンブラン領域はTM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、およびTM7と命名されている。TM3がシグナル伝達に関与している。

【0004】システイン残基のホスホリレーションおよびリビデーション（バリミチレーションまたはファルネシレーション）により、いくつかのG蛋白結合受容体のシグナル伝達が影響を受ける可能性がある。たいていのG蛋白結合受容体は、3番目の細胞質ループおよび／またはカルボキシ末端に潜在的なホスホリレーション部位を有する。いくつかのG蛋白結合受容体、例えば β -アドレナリン受容体については、蛋白キナーゼAおよび／または特異的受容体キナーゼによるホスホリレーションにより受容体脱感作がなされる。いくつかの受容体については、G蛋白結合受容体のリガンド結合部位は、いくつかのG蛋白結合受容体トランスメンブランドメインにより形成された親水性ソケットを含むと考えられており、該ソケットはG蛋白結合受容体の疎水性残基により囲まれていると考えられている。各G蛋白結合受容体トランスメンブランヘリックスの親水性部位は内側を向き、極性リガンド結合部位を形成すると考えられる。TM3は、リガンド結合部位（例えば、TM3のアスパラギン酸残基）を有するようないくつかのG蛋白結合受容体中に含まれている。TM5のセリン、TM6のアスパラギンおよびTM6もしくはTM7のフェニルアラニンもしくはチロシンもリガンド結合に関与している。ヘテロ3量体G蛋白により、G蛋白結合受容体は種々の細胞内酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内で結合されうる（Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10:317-331参照）。別のG蛋白 α -サブユニットは特定のエフェクターを優先的に刺激して、細胞中の種々の生物学的機能を転調させる。G蛋白結合受容体の細胞質残基のホスホリレーションは、いくつかのG蛋白結合受容体のG蛋白結合の調節のための重要な機構であると同定されている。G蛋白結合受容体は哺乳動物宿主中の多くの部位に見いだされている。

【0005】過去15年間にわたり、7トランスメンブラン（7TM）受容体を標的とする約350種の治療薬の市場導入が成功している。このことは、これらの受容

体が、治療標的として確立され証明された歴史を有することよを示すものである。細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病を包含（これらに限らない）する機能不全を予防、改善または修正することにおいて役割りを果たすことのできるさらなる受容体の同定および特徴づけが明らかに必要である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】1の態様において、本発明は、HE8CH90ポリペプチドならびにその製造のための組み換え物質および方法に関する。本発明のもう1つの態様は、HE8CH90ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。かかる方法は、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症；詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病の治療を包含する。さらにもう1つの態様において、本発明は、本発明により提供される材料を用いるアンタゴニストおよびアゴニストの同定方法、ならびに同定された化合物を用いるHE8CH90のバランス不良関連症状の治療方法に関する。さらにもう1つの態様は、不適当なHE8CH90活性またはレベルに関連した疾病の検出のための診断アッセイに関する。

【0007】

【課題を解決するための手段および発明の実施の形態】
定義

下記定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を容易にするためのものである。「HE8CH90」は、一般的には、配列番号：2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその対立遺伝子変種をいう。「受容体活性」または「受容体の生物学的活性」は、該HE8CH90の代謝的または生理学的機能をいい、類似の活性または改善された活性または望ましくない副作用を減じられたこれらの活性を包含する。該HE8CH90の抗原性および免疫原性の活性も含まれる。「HE8CH90遺伝子」は、配列番号：1に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその対立遺伝子変種および／またはその相補物をいう。

【0008】本明細書の用語「抗体」は、ポリクローナ

ルおよびモノクローナル抗体、キメラ、1本鎖、ならびにヒト化抗体、さらにはFabフラグメントを包含し、Fabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの生成物も包含する。「単離」とは、「人間の手により」天然の状態から変化させられた、すなわち、それが天然に存在する場合、元来の環境から変化させるもしくは取り除く、またはその両方を行ったことを意味する。例えばポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、天然の状態で生存動物に存在する場合は、「単離」されていないが、同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、天然に共存する物質から分離されている場合は、本明細書に用いる用語である、「単離」がなされている。

【0009】「HE8CH90ポリヌクレオチド」は、HE8CH90ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、あるいは配列番号：2のポリペプチドまたはその対応フラグメントをコードしているヌクレオチドに対して少なくとも100%の同一性を有するヌクレオチド配列、あるいは配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して十分な同一性を有して、増幅に使用可能な条件下でハイブリダイゼーションし、またプローブもしくはマーカーとして使用されるヌクレオチド配列をいう。

【0010】「ポリヌクレオチド」とは、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであってよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを意味する。

「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物または一本鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより通常的には二本鎖もしくは三本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物でよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を意味するが、これに限定するものではない。さらに、本明細書で用いるポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を意味する。安定性またはその他の理由で修飾した骨格を有するDNAまたはRNAは、本明細書の用語「ポリヌクレオチド」に含まれる。イノシン等の通常的でない塩基、またはトリチル化塩基等の修飾塩基は「修飾」された塩基に含まれる。種々の修飾がDNAおよびRNAについて行われているので、「ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドのかかる化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびにウイルスおよび、例えば単細胞および複合細胞等の細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。また、「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと称される短いポリヌクレオチドを包含する。

【0011】「ポリペプチド」は、ペプチド結合または

修飾したペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたは蛋白を意味する。「ポリペプチド」は、通常、例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖、および一般的に蛋白と称する長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは20種の遺伝子によりコードされたアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有できる。「ポリペプチド」には、プロセッシングおよびその他の翻訳後修飾のような天然の工程により修飾されたものが含まれるが、当業者に周知の化学修飾技術によっても修飾される。このような修飾は基礎的な参考書およびさらに詳細な論文ならびに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。同一の型の修飾は該ポリペプチドの幾つかの部位で、同一または異なる程度で存在し得ることは理解されよう。また、該ポリペプチドは多くの型の修飾をも含み得る。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端等のポリペプチドの任意の部位で起こりうる。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジレインシトールの共有結合、交差架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、交差架橋共有結合形成、システイン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、蛋白加水分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマーカルボキシル化、水酸化およびADPリボシル化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなトランスファーRNA媒介の蛋白へのアミノ酸の添加、ならびにユビキチネーションなどがある。例えばProteins-Structure and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、ニューヨーク(1993)およびPosttranslational Covalent Modification of Proteins、B. C. Johnson編、アカデミックプレス、ニューヨーク(1983)のWold、F.、Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects、1~12頁; Seifterら、Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990)およびRattanら、Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging、Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)を参照されたい。

【0012】本明細書で用いる「変種」なる用語は、対照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは各々異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドであるが、本質的な特性は保持している。典型的なポリヌクレオチドの変種は、別の対照ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列の差異は、対照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ

酸配列を変化させるものであってもよく、変化させないものであってもよい。ヌクレオチドの変化は結果的に、以下に論じるように、対照配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠損、融合および末端切断を招く。典型的なポリペプチドの変種は、別の対照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般的に差異は、対照ポリペプチドおよび変種の配列が、全体的に非常に類似しており、多くの領域で同一であるように限定される。変種および対照ポリペプチドは、1またはそれ以上の置換、付加、欠損が任意の組み合わせで起こることにより、アミノ酸配列が変化し得る。置換または挿入したアミノ酸残基は、遺伝的コードによりコードされたものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は例えば対立遺伝子変種のような天然発生のものでよいが、または天然に発生することが知られていない変種でよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然発生変種は、突然変異技術または直接的合成により製造できる。

【0013】「同一性」とは、当該分野に周知であるように、二つもしくはそれ以上のポリペプチド配列また二つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係であり、配列を比較して決定する。当該分野において、「同一性」とは、場合によってはこのような配列の鎖の適合性により決定できる、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の配列関連性の程度をも意味する。「同一性」および「類似性」は共に既知の方法により容易に算出できる(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編、オックスフォード・ユニバーシティー・プレス、ニューヨーク、1988年; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1993年; Computer Analysis of Sequence Data, パート I, Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 編、ヒューマン・プレス、ニュージャージー、1994年; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G.、アカデミック・プレス、1987年; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編、Mストックトン・プレス、ニューヨーク、1991年)。二つの配列の同一性および類似性を測定する方法は多くあるが、両用語共当業者に周知である(Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G.、アカデミック・プレス、1987年; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編、Mストックトン・プレス、ニューヨーク、1991年; ならびに Carillo, H. および Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988))。配列間の同一性または類似性を測定するために通常用いられる方法はCarillo, H. および Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) 等に掲示されているが、これらに限定するものではない。同一性を決定するための好ましい方法は、試験する配列間で最も良く適合するように設計される。同一性および類似性を決定す

る方法は、公に入手できるコンピュータープログラムに集成されている。二つの配列間の同一性および類似性を測定する好ましいコンピュータープログラム法には、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J. ら、Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Atschul, S. F. ら、J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)) 等があるが、これらに限定するものではない。

【0014】本発明のポリペプチド

本発明HE8CH90は、配列番号：2のポリペプチド；ならびに配列番号：2のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号：2の全長に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、さらに好ましくは少なくとも90%の同一性、そのうえさらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを包含する。配列番号：2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの全長に対して少なくとも80%の同一性、さらに好ましくは少なくとも90%の同一性、そのうえさらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドもHE8CH90ポリペプチドに含まれる。好ましくは、HE8CH90ポリペプチドは、その受容体の少なくとも1つの生物学的活性を示す。HE8CH90ポリペプチドは「成熟」蛋白の形態であってもよく、あるいは融合蛋白のごとき大型の蛋白の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基のごとき精製を促進する配列、または組み換え法を行っている間の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を含んでいることがしばしば有利である。

【0015】生物学的に活性のあるHE8CH90のフラグメントも本発明に含まれる。フラグメントは、前述のHE8CH90ポリペプチドのアミノ酸配列のすべてではなく一部に対して全く同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。HE8CH90ポリペプチドでは、フラグメントは「独立して存在するもの (freestanding)」であるか、または一部分もしくは領域を形成するより大きなポリペプチド内に含まれていてもよく、最も好ましくは単一の連続した領域として、単一のより大きなポリペプチドに含まれる。本発明ポリペプチドフラグメントの典型例は、例えば、HE8CH90ポリペプチドのアミノ酸番号約1~20、21~40、41~60、61~80、81~100および101から末端までからなるフラグメントを包含する。この意味において、「約」とは、片方の端または両端において、示された数よりも数個、5個、4個、3個、2個または1個多いかまたは少ない範囲を含む。好ましいフラグメントは、例えば、アミノ末端を含む一連の残基が欠失、またはカルボキシ末端を含む一連の残基が欠失、あるいは一方がアミノ末端でもう一方がカルボキシ末端を含む2種

の一連の残基が欠失していること以外はHE8CH90ポリペプチドのアミノ酸配列を有する末端切断ポリペプチドを包含する。また、構造的または機能的属性により特徴づけられたフラグメント、例えばアルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域、ベータシートおよびベータシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可変領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原性指標領域を含むフラグメントなども好ましい。受容体活性を媒介する、生物学的に活性な領域もまた好ましく、類似の活性もしくは改善された活性のある、または望ましくない活性を減じたフラグメント等がある。動物、とりわけヒトにおいて抗原的または免疫原的なフラグメントもまた含まれる。

【0016】好ましくは、これらのポリペプチドのすべては、抗原性の活性を含めて受容体の生物学的活性を保持している。上記配列およびフラグメントの変種もこのグループに含まれる。好ましい変種は、保存的アミノ酸置換により変化したものであり、すなわち、同様の特性を有するアミノ酸により置換されているものである。典型的なかかる置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間；SerおよびThr間；AspおよびGlu間；AsnおよびGln間；ならびに塩基性残基LysおよびArg間；あるいは芳香族残基PheおよびTyr間におけるものである。数個、5ないし10個、1ないし5個、または1ないし2個のアミノ酸がいずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されている変種が特に好ましい。

【0017】いずれの適当な方法でも本発明HE8CH90ポリペプチドを製造することができる。かかるポリペプチドは、単離された天然ポリペプチド、組み換え法によるポリペプチド、合成法によるポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせによるポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドの製造手段は当該分野においてよく知られている。

【0018】本発明のポリヌクレオチド

本発明のもう1つの態様は、HE8CH90ポリヌクレオチドに関する。HE8CH90ポリヌクレオチドは、HE8CH90ポリペプチドおよびフラグメントをコードしているポリヌクレオチド、ならびにそれらに密接に関連しているポリヌクレオチドを包含する。より詳細には、本発明HE8CH90ポリヌクレオチドは、配列番号：2のHE8CH90ポリペプチドをコードしている配列番号：1に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、ならびに配列番号：1の特定の配列を有するポリヌクレオチドを包含する。さらにHE8CH90ポリヌクレオチドは、配列番号：2のHE8CH90ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対して全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチ

ド配列を含むポリヌクレオチド、配列番号：1の配列を有するポリヌクレオチドに対して全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。またHE8CH90ポリヌクレオチドは、配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して十分な同一性を有し、増幅に使用可能であるかまたはプローブもしくはマーカーとして使用される条件下でハイブリダイゼーションするに十分な同一性を有するヌクレオチド配列でもある。また本発明は、かかるHE8CH90ポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドも提供する。ヒト・HE8CH90をコードしているcDNAの配列決定の結果により示されるように、本発明HE8CH90は、G蛋白結合受容体の他の蛋白に構造的に関連している。そのcDNA配列は、351個のアミノ酸残基の蛋白をコードしている読み枠を含み、推定分子量39.08kDaである。図1のHE8CH90（配列番号：2）は、EDG2受容体（Zondag et al, AC#Y09479、未公表、1996年）に対して314個のアミノ酸残基において約56.4%の同一性を有する（FASTAを用いた場合）。さらにそのうえ、HE8CH90（配列番号：2）は、REC1受容体（AC#U48235、Premont et al, 未公表、1996年）に対して307個のアミノ酸残基において58%の同一性を有する。さらにそのうえ、HE8CH90（配列番号：2）は、ヒト・EDG1様受容体（AC#P21453、Maciag, T. et al, J. Biol. Chem. 265:9308-9313, 1990）に対して35.1%の同一性を有する。図1のHE8CH90遺伝子（配列番号：1）は、Mus Musculusのリゾホスファチジン酸受容体V2g-1（AC#U70622、Hecht J.H. et al, J. Cell Biol. 135(4), 1071-1083, 1996）に対して778個のヌクレオチド残基において約63.24%の同一性がある（BLASTを用いた場合）。さらにそのうえ、HE8CH90（配列番号：1）は、マウスの推定上のG蛋白結合受容体RECL（AC#U48235、Macrae, A.D. et al, 未公表）に対して778個のヌクレオチド塩基残基において63.11%の同一性がある。さらにそのうえ、HE8CH90（配列番号：1）は、ヒト・EDG2様受容体（AC#U78192、Zondag et al, 未公表、1996）に対して778個のヌクレオチド塩基残基において60.93%の同一性がある。

【0019】標準的クローニングおよびスクリーニングを用い、ヒト胎児の脳またはヒトの8週的全胚の細胞中のmRNA由来のcDNAライブラリーから、発現配列タグ（EST）分析（Adams, M.D., et al. Science(1991) 252:1651-1656; Adams, M.D. et al., Nature(1992) 355:632-634; Adams, M.D., et al., Nature(1995) 377 Supp:3-174）を用いて、HE8CH90をコードしている本発明の1のポリヌクレオチドを得てもよい。ゲノムDNAライブラリーのごとき天然起源から本発明ポリヌクレオチドを

得ることもでき、あるいはよく知られ市販されている方法を用いて合成することもできる。

【0020】よって、配列番号：2のHE8CH90ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列は図1のコーディング配列（配列番号：1）に対して全長にわたって同一であってもよく、あるいは配列番号：2のポリペプチドをコードしている好ましくはヌクレオチド配列の縮重形態であってもよく、あるいは配列番号：2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対して非常に高い同一性を有するものであってもよい。好ましくは、本発明ポリペプチドは、HE8CH90ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対して高い同一性、少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列、あるいは図1（配列番号：1）に示すヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列、あるいは配列番号：2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0021】本発明ポリヌクレオチドをHE8CH90ポリペプチドの組み換え生産に用いる場合、ポリヌクレオチドはそれ自体、成熟ポリペプチドまたはそのフラグメントのコーディング配列を含むものであってもよく；あるいは他のコーディング配列を伴った読み枠中の成熟ポリペプチドまたはフラグメントのコーディング配列を含むものであってもよい。他のコーディング配列としては、例えば、リーダーまたは分泌配列、プレ、プロ、プロセソ蛋白配列をコードするコーディング配列、または他の融合ペプチド部分が挙げられる。例えば、融合ポリペプチドの精製を促すマーカー配列をコードしていてもよい。本発明のある好ましい態様において、マーカー配列は、pQEベクター（Qiagen, Inc.）に提供されるようなヘキサヒスチジンペプチド（Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:821-824（1989）に記載される）またはHAタグ（Wilsonら、Cell, 37:767（1984））である。本発明のポリヌクレオチドはまた、構造遺伝子および遺伝子発現を調節する天然の配列をも含むが、これらに限定するものではない。ポリヌクレオチドは、例えば、転写された非翻訳配列、終止シグナル、リボソーム結合部位、mRNAを安定化する配列、イントロン、ポリアデニル化シグナル等の転写非翻訳配列、および付加アミノ酸をコードする付加コーディング配列等の非コーディング5'および3'配列等の非コーディング配列をも含有していてもよい。

【0022】本発明の特に好ましい具体例は、図1に示すアミノ酸配列（配列番号：2）を有するHE8CH90ポリペプチドおよびその変種をコードしているポリヌクレオチドである。さらなる好ましい具体例は、図1のHE8CH90のアミノ酸配列（配列番号：2）を有しているが、数個、5ないし10個、1ないし5個、1ないし3個、1ないし2個または1個のアミノ酸残基がい

ずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されているHE8CH90変種をコードしているポリヌクレオチドである。さらに本発明は、上記配列にハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドにも関する。この点において、本発明は、厳密な条件下で上記ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドに特別に関連する。本明細書の用語「厳密な条件」とは、配列間に少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合にのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

【0023】配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して十分に同一である本発明ポリヌクレオチドをcDNAおよびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして用いて全長のcDNAおよびHE8CH90をコードしているゲノムクローンを単離し、またHE8CH90遺伝子に対して高い類似性を有する配列を有するcDNAおよび他の遺伝子のゲノムクローンを単離してもよい。かかるハイブリダイゼーション法は当業者に知られている。典型的には、これらのヌクレオチド配列は、対照に対して70%、好ましくは80%、より好ましくは90%の同一性を有する。一般的には、プローブは少なくとも15個のヌクレオチドを含む。好ましくは、かかるプローブは少なくとも30個のヌクレオチドを有し、少なくとも50個のヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは30ないし50個の範囲のヌクレオチドを含む。1の具体例において、G蛋白結合受容体をコードしているポリヌクレオチドを得ることは、配列番号：1またはそのフラグメント配列を有する標識プローブを用いて厳密なハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングし、次いで、該ポリヌクレオチド配列を有する全長のcDNAおよびゲノムクローンを単離する工程を含む。かかるハイブリダイゼーション法は当業者によく知られている。厳密なハイブリダイゼーション条件は上で定義したものであるか、または50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20マイクログラム/mlの変性剪断サケ・精子DNAを含む溶液中、42℃で一晩、次いで、約65℃での0.1xSSC中での洗浄といった条件であってもよい。本発明ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、動物およびヒトの疾病の研究試薬ならびに治療および診断のための材料として用いてもよい。

【0024】ベクター、宿主細胞、発現

本発明はまた、ポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作する宿主細胞および組換え技法による本発明のポリペプチドの製造にも関する。無細胞翻訳系もまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いて、このよう

な蛋白を製造できる。組換え体を製造するために、宿主細胞を遺伝子操作して、発現系もしくはそれらの一部、または本発明のポリヌクレオチドを組み込むことができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986) ; Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1989) のように、多くの標準的な実験マニュアルに記載される方法により行うことができ、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレープ負荷 (scrapeloining)、バリスティック導入 (Ballistic introduction) および感染等がある。

【0025】適当な宿主の代表的なものには、細菌細胞、例えば連鎖球菌属 (streptococci)、ブドウ球菌属 (staphylococci)、大腸菌 (E. coli)、ストレプトミセスおよび枯草菌 (Bacillus subtilis) 細胞；真菌細胞例えば酵母細胞およびアスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞；昆虫細胞例えばショウジョウバエS2 (Drosophila S2) およびスポドプテラSf9 (Spodoptera Sf9) 細胞；動物細胞例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293およびボウズ (Bovus) 黒色腫細胞；ならびに植物細胞等がある。

【0026】本発明のポリペプチドを製造するために非常に多くの発現系を使用できる。このようなベクターには、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばパキウイルス、パポウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、ならびにそれらを組み合わせた物に由来するベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等がある。発現系の構築物には発現を制御および引き起こす調節領域を含有できる。一般的には、宿主中にポリヌクレオチドを保持、伸長または発現するのに、および/またはポリペプチドを発現するのに適した任意の系またはベクターを、この点に関する発現に使用できる。周知のおよび通常的な種々の任意の技術により、適当なDNA配列を発現系に挿入でき、例えばSambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (上述) に記載されている。

【0027】翻訳蛋白を、小胞体内腔、ペリプラスミックススペースまたは細胞外環境へ分泌させるために、適当

な分泌シグナルを発現するポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルはポリペプチドに本来のものであっても、あるいは異種性のシグナルでもよい。

【0028】HE8CH90ポリペプチドをスクリーニングアッセイのために発現させる場合、一般的には、細胞表面にポリペプチドを生産させるのが好ましい。この場合、スクリーニングアッセイに使用する前に細胞を集めてもよい。HE8CH90ポリペプチドを培地中でスクリーニングする場合、培地を回収してポリペプチドを回収し精製することができる。細胞内に生成される場合、まず細胞を溶解し、次いで、ポリペプチドを回収しなければならない。HE8CH90ポリペプチドは周知の方法により、組換え細胞培養物から回収および精製でき、その方法には例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー等がある。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）を精製に用いるのが最も好ましい。ポリペプチドが単離および／または精製中に変性した場合、再び活性な立体配座にするために、蛋白再生のための周知の技法を用いることができる。

【0029】診断アッセイ

本発明はまた診断試薬としての本発明HE8CH90ポリヌクレオチドの使用にも関する。真核生物とりわけ哺乳動物、特にヒトにおけるHE8CH90の検出は、疾患の診断のための診断法を提供する。真核生物（本明細書において「個体」とも称する）とりわけ哺乳動物、特にヒトがHE8CH90遺伝子を含む生物に感染すると、種々の方法によりDNAレベルで検出できる。診断用の核酸は、感染した個体の細胞および組織、例えば骨、血液、筋肉、軟骨および皮膚より得ることができる。ゲノムDNAは直接的に検出するのに使用できるか、または分析の前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅できる。RNAまたはcDNAもまた同じ方法で用いることができる。増幅法を用いると、真核生物とりわけ哺乳動物、特にヒトに存在する原核生物株を、原核生物遺伝子の遺伝子型の分析により特徴づけることができる。対照配列の遺伝子型に比較した増幅産物の大きさの変化により、欠損および挿入を検出できる。点突然変異は、増幅DNAを標識化HE8CH90ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることにより同定できる。完全に対合した配列はRNアーゼ消化により、または融解温度の差により、誤対合二重らせんから区別できる。DNA配列の差はまた、変性物質を伴うまたは伴わないゲル中のDNAフラグメントの電気泳動の移動度の変化を検出することにより、また

は直接的なDNAの配列決定により検出できる。例えば Meyers et al. Science, 230:1242 (1985) 参照。特異的な位置での配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ例えばRNアーゼおよびS1保護または化学的切断法によっても明らかにすることができる。例えば Cotton et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:4397-4401 (1985) 参照。もう1つの具体例において、IL-1 β ベータヌクレオチド配列由来のフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ (array) を構築して、例えば遺伝学的変異の有効なスクリーニングを行うことができる。アレイ法はよく知られており、広い適用範囲があり、遺伝子発現、遺伝学的連関および遺伝学的変化を包含する分子遺伝学における種々の問題を解明するためにこの方法を用いることができる（例えば、M. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)）。

【0030】診断アッセイは、本明細書記載の方法によりHE8CH90遺伝子の変異を検出することにより、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病または Gilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病に対する感受性の診断または決定方法を提供する。

【0031】さらに、対象由来の試料の異常に上昇または低下したHE8CH90ポリペプチドまたはHE8CH90 mRNAレベルを調べることを特徴とする方法によって、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病または Gilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病を診断することができる。HE8CH90ポリヌクレオチドの発現の増加または低下は、ポリヌクレオチドの定量法として当該分野で周知の方法の任意の方法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロッティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて測定できる。宿主由来のサンプル中のHE8CH90蛋白のレベルを決定するために用いることができるアッセイ法は、当業者に周知である。このようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等がある。

【0032】染色体アッセイ

本発明ヌクレオチド配列は染色体の同定にも価値がある。該配列は、個々のヒト・染色体上の特定の位置を標的とし、これにハイブリダイゼーションしうる。本発明による重要な部分の染色体へのマッピングは、それらの配列を遺伝子関連疾病と関連づける重要な第1工程である。配列を正確な染色体位置にマッピングしたならば、染色体上の配列の物理的位置を遺伝学的地図のデータと関連づけることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Weich Medical Libraryからオンラインで利用できる)に見いだされる。次いで、連関(物理的に近接した遺伝子の同時遺伝)の分析により、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾病との関係を同定する。罹病個体と未罹病個体との間のcDNAまたはゲノム配列の相違も調べることができる。罹病個体のいくつかまたは全部において変異が観察されるが正常個体においては観察されない場合、その変異は疾病の原因である可能性がある。

【0033】抗体

本発明のポリペプチドもしくはそれらの変種、またはそれらを発現する細胞は、このようなポリペプチドに免疫特異的な抗体を産生する免疫原として用いることができる。本明細書で用いる「抗体」には、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラ、一本鎖、サル化抗体およびヒト化抗体、ならびにFab免疫グロブリン発現ライブラリーの産物等のFabフラグメント等がある。本発明のポリペプチドに対して生じる抗体は、ポリペプチドまたはエピトープが付いたフラグメント、アナログまたは細胞を、好ましくはヒトはでない動物に、通常の実験法を用いて投与することにより得ることができる。連続的細胞系培養により産生される抗体を提供する、当業者周知の技術を用いて、モノクローナル抗体を調製することができる。実例としては、Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256:495-497 (1975); Kozbor et al. Immunology Today, 4:72 (1983); Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., 77-96頁 (1985)に記載されるような種々の技法がある。

【0034】一本鎖抗体の産生のために記載された技術(米国特許第4946778号)は、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産生するのに適用できる。また、トランスジェニックマウスまたはその他の生物、例えばその他の哺乳動物は、ヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。上記抗体を用いて、ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定してもよく、あるいはアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製してもよい。

【0035】HE8CH90ポリペプチドに対する抗体を用いて、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染の

ごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染; 痛み; 癌; 拒食症; 大食症; 喘息; パーキンソン病; 急性心臓疾患; 低血圧; 高血圧; 尿閉; 骨粗鬆症; 狭心症; 心筋梗塞; 潰瘍; アレルギー; 良性前立腺肥大; ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害(例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群)を包含する精神病および神経学的疾病を治療してもよい。

【0036】ワクチン

10 本発明の別の態様は、哺乳動物における免疫学的反応を誘起する方法に関し、該方法は、抗体および/またはT細胞を産生させるに十分なHE8CH90またはそれらのフラグメントを哺乳動物に接種して、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染; 痛み; 癌; 拒食症; 大食症; 喘息; パーキンソン病; 急性心臓疾患; 低血圧; 高血圧; 尿閉; 骨粗鬆症; 狭心症; 心筋梗塞; 潰瘍; アレルギー; 良性前立腺肥大; ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害(例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群)を包含する精神病および神経学的疾病から該動物を防御することを特徴とする。本発明のもう1つの態様は、哺乳動物における免疫学的応答を誘導する方法に関し、該方法は、HE8CH90ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変種を発現させるための核酸ベクターを送達し、インビボでHE8CH90ポリペプチドを発現させて、該動物を疾患から保護する抗体を生じる、かかる免疫学的応答を誘導することを特徴とする。

30 【0037】本発明のさらなる態様は免疫学的ワクチン処方(組成物)に関し、それは、哺乳動物宿主中に導入された場合、HE8CH90ポリペプチドに対する哺乳動物の免疫学的応答を誘導する。該組成物はHE8CH90ポリペプチドまたはHE8CH90遺伝子を含んでなる。ワクチン処方、さらに適当な担体を含んでもよい。HE8CH90ポリペプチドは胃で分解される可能性がある、好ましくは非経口投与する(皮下、筋肉内、静脈、皮内等への注射を包含)。非経口投与に適した処方、抗酸化剤、バッファー、静細菌剤および処方レシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい水性または非水性滅菌注射用溶液; ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい水性または非水性滅菌懸濁液を包含する。処方を1回量または複数回として容器に入れて提供してもよく、例えば、密封アンプルおよびバイアルに入れて提供してもよく、また使用直前に滅菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態として保存してもよい。またワクチン処方、水中油系および当該分野で知られた他の系のごとき処方の免疫原性を高めるためのアジュバント系を含んでもよい。用量は、個々のワクチンの活性に左右され、通常の実験に

より容易に決定することができる。

【0038】スクリーニングアッセイ

本発明受容体ポリペプチドに結合してこれを活性化（アゴニスト）または阻害（アンタゴニスト）する化合物のスクリーニングプロセスにおいて本発明HE8CH90を用いてもよい。よって、本発明ポリペプチドを用いて、小型分子基質およびリガンド、例えば細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然産物混合物の結合を評価してもよい。これらの基質およびリガンドは天然の基質およびリガンドであってもよく、あるいは構造または機能を模倣したものであってもよい。Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter5(1991)参照。

【0039】HE8CH90蛋白は哺乳動物宿主に広く存在し、多くの生物学的機能に関与しており、多くの病気にもかかわっている。したがって、HE8CH90を刺激する化合物および薬剤、あるいはまたHE8CH90を阻害する化合物または薬剤を見いだすことが望まれる。一般的には、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病のごとき状態を治療または予防するためにアゴニストが用いられる。細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染のごとき感染症、詳細にはHIV-1またはHIV-2による感染；痛み；癌；拒食症；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心臓疾患；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性前立腺肥大；ならびに不安症、分裂病、躁鬱病、せん妄、痴呆、重度の精神遅滞および運動障害（例えば、Huntington病またはGilles de la Tourette症候群）を包含する精神病および神経学的疾病のごとき状態の種々の治療または予防のためのアンタゴニストを用いてもよい。

【0040】一般的には、かかるスクリーニング手順は、細胞表面に本発明受容体ポリペプチドを発現する適当な細胞を製造することを含む。かかる細胞は、哺乳動物由来の細胞、酵母、ショウジョウバエ（*Drosophila*）または大腸菌（*E. coli*）を包含する。次いで、受容体発現細胞（または発現された受容体を含む細胞膜）を試験化合物と接触させて、結合または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。

【0041】1のスクリーニング方法は、本発明受容体を発現する細胞（例えば、トランスフェクションされたCHO細胞）を使用し、系において受容体活性化により引き起こされる細胞外pHまたは細胞内カルシウム変化

を測定することを用いる。この方法において、本発明受容体ポリペプチドを発現する細胞に化合物を接触させてもよい。次いで、2次のメッセンジャー応答、例えば、シグナル伝達、pH変化、またはカルシウムレベル変化を測定して候補化合物が受容体を活性化または阻害するかどうかを決定する。

【0042】もう1つの方法は、受容体により伝達されるcAMPおよび／またはアデニレートシクラーゼ蓄積の阻害または刺激を調べることにより受容体阻害剤をスクリーニングすることを包含する。かかる方法は、本発明受容体で真核細胞をトランスフェクションして細胞表面に受容体を発現させることを用いる。次いで、本発明受容体存在下において細胞を候補アンタゴニストと接触させる。次いで、cAMP蓄積量を測定する。候補アンタゴニストが受容体に結合し、受容体結合を阻害する場合には、受容体により伝達されるcAMPのレベルまたはアデニレートシクラーゼ活性が低下または上昇するであろう。

【0043】本発明受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを検出するためのもう1つの方法は、米国特許第5482835号記載の酵母による方法である。そのアッセイは候補化合物の結合を試験するだけでよく、候補化合物に直接的または間接的に結合した標識を用いることにより、あるいは標識競争物質との競争を用いるアッセイにより、受容体を有する細胞への付着を検出する。さらに、これらのアッセイにおいて、受容体を表面に有する細胞に適する検出系を用いて、受容体活性化により発生するシグナルを候補化合物が生じるかどうかを試験してもよい。一般的には、既知アゴニスト存在下において活性化阻害剤をアッセイし、アゴニストによる活性化に対する候補化合物の存在の影響を観察する。かかるスクリーニングアッセイを行うための標準的方法は当該分野においてよく理解されている。潜在的なHE8CH90アンタゴニストの例は、抗体、あるいはいくつかの場合にはオリゴヌクレオチドまたはHE8CH90のリガンドに密接に関連した蛋白（例えば、リガンドのフラグメント、または受容体に結合するが応答を誘発せず、その結果受容体活性を保持する小型分子）を包含する。

【0044】予防および治療方法

本発明は、過剰または不十分な量のHE8CH90活性に関連する異常な状態の処置方法を提供する。HE8CH90活性が過剰な場合、いくつかの方法を用いることができる。1の方法は、有効量の上記阻害剤化合物（アンタゴニスト）を医薬上許容される担体とともに対象に投与して、HE8CH90へのリガンドの結合をブロックすることあるいは第2のシグナルを阻害することにより活性化を阻害し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。

【0045】もう1つのアプローチにおいて、内在性HE8CH90と競争してリガンドに結合する能力をやは

り有している可溶性形態のHE8CH90ポリペプチドを投与してもよい。かかる競争物質の典型的な具体例はHE8CH90ポリペプチドのフラグメントを含む。

【0046】さらにもう1つの方法において、発現ブロック法を用いて内在性HE8CH90をコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。知られているかかる方法には、細胞内で生成した、あるいは別個に投与されたアンチセンス配列を用いる。例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)中、O' Cocco, J. Neurochem(1991)56:560を参照のこと。別法として、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供してもよい。例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res(1979)6:3073; Cooney et al., Science(1988)241:456; Derivan et al., Science(1991)251:1360参照。これらのオリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは重要部分のオリゴマーをインビボで発現させることもできる。

【0047】HE8CH90およびその活性の発現不足に関連する異常な症状の処置には、いくつかの方法が用いられる。1の方法は、HE8CH90を活性化する治療上有効量の化合物(すなわち上記アゴニスト)を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。別法として、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞によるHE8CH90の細胞内での生成を有効ならしめてもよい。例えば、上記のごとく本発明ポリヌクレオチドを処理加工して複製欠損レトロウイルスベクターに入れて発現するようにしてもよい。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明ポリペプチドをコードしているRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターでトランスダクションしたパッケージング細胞中に導入して、今度はパッケージング細胞が目的遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生成するようにしてもよい。これらのプロデューサー細胞を対象に投与して細胞をインビボで処理加工して、インビボでポリペプチドを発現するようにしてもよい。遺伝子治療の概説としては、Human Molecular Genetics, T. Strachan and A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd(1986)中、第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches(およびその中の引用文献)参照。

【0048】処方および投与

可溶性形態のHE8CH90ポリペプチドのごときペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは小型分子を、適当な医薬担体と混合して処方してもよい。かかる処方は、治療上有効量のポリペプチドまたは化合物、および医薬上許容される担体または賦形剤を含んでなる。かかる担体としては、セイライン、緩衝化セイライン、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、こ

れらに限らない。処方は投与経路に適したものとすべきであり、当業者によく知られている。さらに本発明は、上記本発明成分の1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる医薬パックおよびキットにも関する。

【0049】本発明ポリペプチドおよび他の化合物を単独で使用してもよく、あるいは治療化合物のごとき他の化合物と一緒に使用してもよい。医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、注射、典型的には静脈注射を包含する。皮下、筋肉内または腹腔内のごとき他の注射経路を用いることもできる。全身投与のための別の手段は、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のごとき浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を包含する。さらに、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。これらの化合物の投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲル等の形態であってもよい。

【0050】必要な用量範囲は、ペプチド、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。しかしながら、適当な用量は対象の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、種々の使用化合物および種々の投与経路のさまざまな有効性を考慮すれば、必要な用量は広範囲なものと思われる。例えば、経口投与には静脈注射よりも多い用量が必要であると考えられる。当該分野においてよく知られた最適化のための標準的な常套の実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0051】しばしば「遺伝子治療」と称される上記治療方法において、処置に使用するポリペプチドを対象中において得ることもできる。よって、例えば、レトロウイルスプラスミドベクターを用いて対象由来の細胞をDNAまたはRNAのごときポリヌクレオチドでエキスビボで処理加工してもよい。次いで、細胞を対象に導入する。

【0052】

【実施例】特記しないかぎり、当業者によく知られた標準的方法を用いて下記実施例を行う。実施例は本発明を例示説明するものであり、本発明を限定するものではない。

実施例1

cDNA配列をコードしている7-TMドメインを伴う発現配列タグ(EST)として知られる短い配列からなるHuman Genome SciencesからのランダムcDNAデータベースをBLASTアルゴリズムを用いて検索することにより、T細胞受容体と相同的なESTが示された。全長のクローンを得るために、自動DNA配列決定を用いてインサートの完全DNA配列を推定した。GCGソフトウェアを用いるDNA配列のマッピング分析により、351個のアミノ酸残基からなる読み枠(ORF)が示された。FASTAおよびBLASTアルゴリズムによるDNA配列

のさらなる分析により、7-トランスメンブラン様G蛋白結合受容体に対するこのポリペプチドの相同性が示された。さらに、lasergene proteanソフトウェアを用いる疎水性プロット分析により、G蛋白結合受容体と共通したいくつかの特徴が示された。最大の特徴は、それぞれ約20ないし30個のアミノ酸からなる7つの疎水的領域の存在であり、それらはG蛋白結合スーパーファミリーの受容体に見いだされる7-トランスメンブラン構造トポロジーを形成する膜貫通ドメインとなっている可能性がある。当該クローンの同一性をさらに確認するために、読み枠(ORF)のヌクレオチド配列を用いてPCRプライマーを設計し、ヒト胎児脳ライブラリーからDNA配列を増幅した。正しいサイズのPCRバンドをPCR 2.1ベクター(Stratageneから得た)中にサブクローンし、配列決定した。

【0053】実施例2：哺乳動物細胞での発現

本発明受容体は、ヒト胚腎臓293細胞(HEK293)または付着性dhfr CHO細胞のいずれかにおいて発現される。受容体発現を最大にするために、CDNまたはpCDNA3ベクターに挿入する前にすべての5'および3'非翻訳領域(UTR)を受容体cDNAから除去した。リポフェクチンにより個々の受容体cDNAで細胞をトランスフェクションし、400mg/mlのG418存在下で選択した。3週間の選択期間後、個々のクローンを拾い、さらなる分析のために増殖させた。ベクターのみでトランスフェクションされたHEK293またはCHO細胞は負の対照として役立った。個々の受容体を安定に発現する細胞系を単離するために、典型的には、約24個のクローンを選択し、ノーザンブロット分析により分析した。受容体mRNAは、分析したG418耐性クローンの約50%において検出された。

【0054】実施例3：結合アッセイおよび機能のアッセイのためのリガンドバンク

スクリーニングのために、200個以上の推定受容体のバンクを集めた。バンクは、ヒトの7トランスメンブラン(7TM)受容体を介して作用することが知られている伝達物質、ホルモンおよびケモカイン；ならびにヒト・7TM受容体の推定アゴニストである天然の化合物、哺乳動物の相当物がまだ同定されていない非哺乳動物の生物学的活性ペプチド；ならびに天然には存在しないが未知の天然リガンドとともに7TM受容体を活性化する化合物を含む。機能(すなわち、カルシウム、cAMP、マイクロフィジオメーター(microphysiometer)、卵母細胞の電気生理学的性質等)のアッセイならびに結合アッセイを用い、このバンクを用いて、まず、既知リガンドの受容体をスクリーニングする。

【0055】実施例4：リガンド結合アッセイ

リガンド結合アッセイは、受容体機能を確認するための直接的方法を提供し、高処理量フォーマットに適用可能

である。受容体に対する精製リガンドを放射性標識して高比活性(50ないし2000Ci/mmol)とし、結合の研究に備える。次いで、放射性標識のプロセスが受容体に対するリガンドの活性を減じないように測定を行う。バッファー、イオン、pHおよびヌクレオチドのごとき他のモジュレーターに関するアッセイ条件を最適化して、膜および全細胞受容体源に関して測定可能な雑音対シグナル比を得る。これらのアッセイのために、過剰の未標識競争リガンドの存在下で測定した放射活性を全結合放射活性から差し引いたものを、特異的受容体結合を定義する。可能ならば、1種よりも多い競争リガンドを用いて残りの非特異的結合を決定する。

【0056】実施例5：アフリカツメガエル・卵母細胞における機能のアッセイ

本発明受容体cDNAをコードしている直鎖状にしたプラスミド鋳型由来のキャップしたRNA転写物を、標準的手順に従ってRNAポリメラーゼを用いて合成する。インビトロ転写物を水に懸濁して最終濃度0.2mg/mlとする。卵巣葉を成体メスのカエルから取り、段階Vの脱卵胞した卵母細胞を得て、Drummond微量注入装置を用いてRNA転写物(10ng/卵母細胞)を50μlのボーラスとして注入する。2個の電極電圧クランプを用いて個々のアフリカツメガエル卵母細胞からの電流を測定する。室温のCa²⁺不含Barth培地中で記録を行う。アフリカツメガエルの系を用いて、リガンド活性化に関して既知リガンドおよび組織/細胞抽出物をスクリーニングすることができる。

【0057】実施例6：マイクロフィジオメトリックアッセイ(Microphysiometric Assays)

種々の2次メッセンジャー系の活性化により、少量の酸が細胞から生じる。大まかにいえば、生じた酸は、細胞内シグナリングプロセスの燃料として必要な代謝活性の増大の結果である。細胞周辺の培地のpH変化は非常に小さいが、サイトセンサー・マイクロフィジオメーター(CYTOSENSOR microphysiometer)(Molecular Devices Ltd., Menlo Park, CA)により検出可能である。よって、CYTOSENSORは、本発明G蛋白結合受容体のごときエネルギーを使用する細胞内シグナリング経路に連動した受容体の活性化を検出することができる。

【0058】実施例7：抽出物/細胞上清のスクリーニング

いままでのところ、リガンドを活性化する同族物質(アゴニスト)は多くの哺乳動物ペプチドの哺乳動物において存在していない。よって、この受容体に対する活性リガンドが、現在に至るまで同定されてきたリガンドバンク中に含まれていない可能性がある。したがって、組織抽出物についても本発明7TM受容体を機能面でスクリーニング(カルシウム、cAMP、マイクロフィジオメーター等を用いる機能のスクリーニング)して天然リガンドを同定する。次いで、正の機能の応答を示す抽出物

をサブフラクションに分けて、活性化リガンドを単離、同定することができる。

【0059】実施例8：カルシウムおよびcAMP機能アッセイ

HEK293細胞において発現される7TM受容体は、PLCおよびカルシウム可動化の活性化および／またはcAMP刺激もしくは抑制に機能的に連動していることが示されている。HEK293細胞、受容体でトランスフェクションされた細胞、あるいはベクターで制御されている細胞における基底カルシウムレベルが正常であること、すなわち100nMないし200nMの範囲であることが観察された。組み換え受容体を発現するHEK293細胞をfura2とともに負荷し、1日で150個以上の選択リガンドまたは組織／細胞抽出物を、アゴニストにより誘導されるカルシウム可動化について評価する。同様に、標準cAMP定量アッセイを用いて、組み換え受容体を発現するHEK293細胞をcAMP産生の刺激もしくは抑制について評価する。カルシウムトランジェントまたはcAMP変動を示すアゴニストをベクターで制御された細胞において試験して、応答が受容体を発現するトランスフェクション細胞に独自のものであるかどうかを決定する。

【0060】

【配列表】

【0061】(1) 一般的情報：

(i) 出願人：サザ、ギャネシュ
バーグスマ、ダーク

(ii) 発明の名称：新規7-トランスメンブラン受容体をコードしているcDNAクローンHE8CH90

(iii) 配列の数：2

(vi) 連絡先：

(A) 宛て名：スミスクライン・ビーチャム

(B) 通り名：スウェードランド・ロード709番 *

(xi) 配列の記載：配列番号：1：

```

ACCCTTGTGT GCACACGCTC CCGGGTCTTA TTAGTAGGTA AGAAACAGCT GCTCCTCCAC 60
CTCCACCCCA GCCCATGGA GCTTGCTTTT TCCAGGCCAC CGTAGTCCTC ACCACTGCCA 120
CTTTGCTTCG AGATGGTCAT CATGGGCCAG TGCTACTACA ACGAGACCAT CGGCTTCTTC 180
TATAACAACA GTGGCAAAGA GCTCAGCTCC CACTGGCGGC CCAAGGATGT GGTCGTGGTG 240
GCACTGGGGC TGACCGTCAG CGTGCTGGTG CTGCTGACCA ATCTGCTGGT CATAGCAGCC 300
ATCGCCTCCA ACCGCGGCTT CCACCAGCCC ATCTACTACC TGCTCGGCAA TCTGGCGCG 360
GCTGACCTCT TCGCGGGCGT GGCCTACCTC TTCCTCATGT TCCACACTGG TCCCGGCACA 420
GCCCCGACTTT CACTTGAGGG CTGGTTCCCTG CGGCAGGGCT TGCTGGACAC AAGCCTCACT 480
GCGTCGGTGG CCACACTGCT GGCCATCGCC GTGGAGCGGC ACCGCAGTGT GATGGCCGTG 540
CAGCTGCACA GCCGCTGCC CCGTGCCCGC GTGGTCATGC TCATTGTGGG CGTGTGGGTG 600
GCTGCCCTGG GCCTGGGGCT GCTGCCTGCC CACTCCTGGC ACTGCCTCTG TGCCCTGGAC 660
CGCTGCTCAC GCATGGCACC CCTGCTCAGC CGCTCCTATT TGGCCGTCTG GGCTCTGTCTG 720
AGCCTGCTTG TCTTCCTGCT CATGGTGGCT GTGTACACCC GCATTTTCTT CTACGTGCGG 780
CGGCGAGTGC AGCGCATGGC AGAGCATGTC AGCTGCCACC CCCGCTACCG AGAGACCACG 840
CTCAGCCTGG TCAAGACTGT TGTATCATC CTGGGGGCGT TCGTGGTCTG CTGGACACCA 900
GGCCAGGTGG TACTGCTCCT GGATGGTTTA GAGCTGTGAGT CCGCAATGT CCTGGCTGTA 960

```

* (C) 都市名：キング・オブ・ブルシア

(D) 州名：ペンシルベニア

(E) 国名：アメリカ合衆国

(F) ZIP：19406

(v) コンピューター・リーダブル・フォーム：

(A) 媒体タイプ：ディスク

(B) コンピューター：IBMコンパチブル

(C) 作動システム：DOS

(D) ソフトウェア：Windowsバージョン2.0

10 用FastSEQ

(vi) 本願のデータ：

(A) 出願番号：不明

(B) 出願日：1997年1月28日

(C) 分類：不明

(vii) 先の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(viii) 代理人等の情報：

(A) 氏名：ハン、ウィリアム・ディ

(B) 登録番号：34344

(C) 代理人等における処理番号：ATG50050

(xi) テレコミュニケーションの情報：

(A) 電話番号：610-270-5219

(B) ファックス番号：610-270-4026

(C) テレックス：

【0062】(2) 配列番号：1に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1260塩基対

(B) 配列の型：核酸

30 (C) 鎖の数：1本

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

27

28

GAAAAGTACT TCCTACTGTT GGCCGAGGCC AACTCACTGG TCAATGCTGC TGTGTACTCT 1020
 TGCCGAGATG CTGAGATGCG CCGCACCTTC CGCCGCCTTC TCTGCTGCGC GTGCCTCCGC 1080
 CAGTCCACCC GCGAGTCTGT CCACTATACA TCCTCTGCCC AGGGAGGTGC CAGCACTCGC 1140
 ATCATGCTTC CCGAGAACGG CCACCCACTG ATGGACTCCA CCCTTTAGCT ACCTTGAAC 1200
 TCAGCGGTAC GCGGCAAGCA ACAAATCCAC AGCCCTGAT GACTTGTGGG TGCTCCTGGC 1260

【0063】(2) 配列番号：2に関する情報：

* (C) 鎖の数：1本

(i) 配列の特徴：

(D) トポロジー：直鎖状

(A) 配列の長さ：351アミノ酸

(ii) 配列の種類：蛋白

(B) 配列の型：アミノ酸

*

(xi) 配列の記載：配列番号：2：

Met Val Ile Met Gly Gln Cys Tyr Tyr Asn Glu Thr Ile Gly Phe Phe
 1 5 10 15
 Tyr Asn Asn Ser Gly Lys Glu Leu Ser Ser His Trp Arg Pro Lys Asp
 20 25 30
 Val Val Val Val Ala Leu Gly Leu Thr Val Ser Val Leu Val Leu Leu
 35 40 45
 Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Ala Ile Ala Ser Asn Arg Arg Phe His
 50 55 60
 Gln Pro Ile Tyr Tyr Leu Leu Gly Asn Leu Ala Ala Asp Leu Phe
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Ala Tyr Leu Phe Leu Met Phe His Thr Gly Pro Arg Thr
 85 90 95
 Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gly Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp
 100 105 110
 Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Thr Leu Leu Ala Ile Ala Val Glu
 115 120 125
 Arg His Arg Ser Val Met Ala Val Gln Leu His Ser Arg Leu Pro Arg
 130 135 140
 Gly Arg Val Val Met Leu Ile Val Gly Val Trp Val Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Gly Leu Leu Pro Ala His Ser Trp His Cys Leu Cys Ala Leu Asp
 165 170 175
 Arg Cys Ser Arg Met Ala Pro Leu Leu Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Val
 180 185 190
 Trp Ala Leu Ser Ser Leu Leu Val Phe Leu Leu Met Val Ala Val Tyr
 195 200 205
 Thr Arg Ile Phe Phe Tyr Val Arg Arg Arg Val Gln Arg Met Ala Glu
 210 215 220
 His Val Ser Cys His Pro Arg Tyr Arg Glu Thr Thr Leu Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Val Ile Ile Leu Gly Ala Phe Val Val Cys Trp Thr Pro
 245 250 255
 Gly Gln Val Val Leu Leu Leu Asp Gly Leu Gly Cys Glu Ser Cys Asn
 260 265 270
 Val Leu Ala Val Glu Lys Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Glu Ala Asn Ser
 275 280 285
 Leu Val Asn Ala Ala Val Tyr Ser Cys Arg Asp Ala Glu Met Arg Arg
 290 295 300
 Thr Phe Arg Arg Leu Leu Cys Cys Ala Cys Leu Arg Gln Ser Thr Arg
 305 310 315 320

29

30

Glu Ser Val His Tyr Thr Ser Ser Ala Gln Gly Gly Ala Ser Thr Arg

325

330

335

Ile Met Leu Pro Glu Asn Gly His Pro Leu Met Asp Ser Thr Leu

340

345

350

【図面の簡単な説明】

* よび推定アミノ酸配列（配列番号：1および2）を示す

【図1】 ヒト・HE8CH90のヌクレオチド配列お* 図である。

【図1】

```

1  ACCCTTGTGTGCACACGCTCCCGGGTCTTATTAGTAGGTAAGAAACAGCTGCTCCTCCAC 60
61  CTCACCCCGAGCCCATGGAGCTTGCTTTTCCAGGCCACCGTAGCTCCTCACCCTGCCA 120
121 CTTTGCTTCGAGATGGTCATCATGGGCCAGTGCTACTACAACGAGACCATCGGCTTCTTC 180
-3      M V I N G Q C Y Y N E T I G F F 16
181 TATAACAACAGTGGCAAAGAGCTCAGCTCCCACTGGCGGCCCAAGGATGTGGTCTGGTG 240
17  Y N N S G K E L S S H W R P K D V V V V 36
241 GCACTGGGGCTGACCGTCAGCGTGCCTGGTGTGCTGACCAATCTGCTGGTCATAGCAGCC 300
37  A L G L T V S V L V L L T N L L V I A A 56
301 ATCGCCTCCAACCGCGCTTCACCCAGCCCATCTACTACCTGCTCGGCAATCTGGCCGCG 360
57  I A S N R R F H Q P I Y Y L L G N L A A 76
361 GCTGACCTCTTCGCGGGCGTGGCCTACCTCTTCCTCATGTTCCACACTGGTCCCGCACA 420
77  A D L F A G V A Y L F L M F H T G P R T 96
421 GCGCGACTTTCACCTTGAGGGCTGGTTCCTGCGGCAGGGCTTGTGGACACAAGCCTCACT 480
97  A R L S L E G W F L R Q G L L D T S L T 116
481 GCGTCGGTGGCCACACTGCTGGCCATCGCCGTGGAGCGGCACCGCAGTGTGATGGCCGTG 540
117 A S V A T L L A I A V E R H R S V M A V 136
541 CAGCTGCACAGCCGCTGCCCGTGGCGCGTGGTCATGCTCATTGTGGCGTGTGGGTG 600
137 Q L H S R L P R G R V V M L I V G V W V 156
601 GCTGCCCTGGGCTGGGGCTGCTGCCCTGCCACTCCTGGCACTGCCCTCTGTGCCCTGGAC 660
157 A A L G L G L L P A H S W H C L C A L D 176
661 CGCTGCTCAGCATGGCACCCCTGCTCAGCCGCTCCTATTTGGCCGCTCTGGGCTCTGTCTG 720
177 R C S R M A P L L S R S Y L A V W A L S 196
721 AGCCTGCTTGCTTCTCTGCTCATGGTGGCTGTGTACACCCGCATTTCTTCTACGTCCG 780
197 S L L V F L L M V A V Y T R I F F Y V R 216
781 CGGCGAGTGCAGCGCATGGCAGAGCATGTCAGCTGCCACCCCGCTACCGAGAGACCACG 840
217 R R V Q R M A E H V S C H P R Y R E T T 236
841 CTCAGCCTGGTCAAGACTGTTGTATCATCCTGGGGCGGTTCTGTGTCTGCTGGACACCA 900
237 L S L V K T V V I I L G A F V V C W T P 256
901 GGCCAGGTGGTACTGCTCCTGGATGGTTTAGGCTGTGAGTCTGCAATGTCTGGCTGTA 960
257 G Q V V L L L D G L G C E S C N V L A V 276
961 GAAAAGTACTTCTACTGTTGGCCGAGGCCAACTCACTGGTCAATGCTGCTGTGTACTCT 1020
277 E K Y F L L L A E A N S L V N A A V Y S 296
1021 TGCCGAGATGCTGAGATGCGCCGACCTTCCGCCGCTTCTCTGCTGCGCGTGCCCTCCG 1080
297 C R D A E H R R T F R R L L C C A C L R 316
1081 CAGTCCACCCGCGAGTCTGTCCACTATACATCCTCTGCCAGGGAGGTGCCAGCACTCGC 1140
317 Q S T R E S V H Y T S S A Q G G A S T R 336
1141 ATCATGCTTCCCGAGAAGGCCACCCACTGATGGACTCCACCCCTTAGCTACCTTGAAC 1200
337 I M L P E N G H P L M D S T L 356
1201 TCAGCGTACGCGGCAAGCAAAATCCACAGCCCTCATGACTTGTGGCTGCTCCTGGC 1260

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/00	A D Z	C 0 7 K 14/705	
45/00		C 1 2 P 21/02	C
48/00	A A B	C 1 2 Q 1/02	
	A D Y	A 6 1 K 37/02	A B F
C 0 7 K 14/705			A B N
C 1 2 N 5/10			A C V
C 1 2 P 21/02			A D Z
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 5/00	B
/(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			

(72) 発明者 ダーク・バーグスマ
 アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バ
 ーウィン、アイリッシュ・ロード271番